

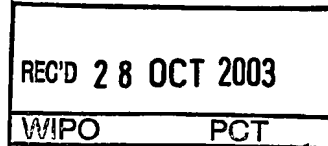


PCT/EP 03 / 10289

# ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT

A-1200 Wien, Dresdner Straße 87

Kanzleigeühr € 20,00  
Schriftengeühr € 78,00



Aktenzeichen A 1397/2002

Das Österreichische Patentamt bestätigt, dass

**die Firma BIOCHEMIE GmbH  
in A-6250 Kundl/Tirol  
(Tirol),**

am **17. September 2002** eine Patentanmeldung betreffend

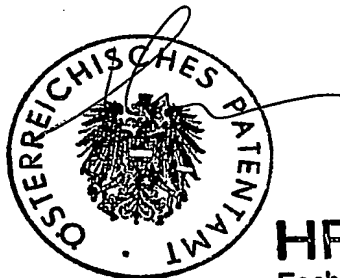
**"Organische Verbindungen",**

überreicht hat und dass die beigeheftete Beschreibung mit der  
ursprünglichen, zugleich mit dieser Patentanmeldung überreichten  
Beschreibung übereinstimmt.

Österreichisches Patentamt  
Wien, am 8. September 2003

Der Präsident:

i. A.



**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

**HRNCIR**  
Fachoberinspektor



## AT PATENTSCHRIFT

(11) Nr.

(Bei der Anmeldung sind nur die eingerahmten Felder auszufüllen - bitte fett umrandete Felder unbedingt ausfüllen!)

(73)	Patentinhaber: <b>BIOCHEMIE GmbH, A-6250 Kundl, Tirol</b>
(54)	Titel: <b>Organische Verbindungen</b>
(61)	Zusatz zu Patent Nr.
(66)	Umwandlung von <b>GM</b> /
(62)	gesonderte Anmeldung aus (Teilung): <b>A</b> /
(30)	Priorität(en):
(72)	Erfinder:

(22) (21) Anmeldetag, Aktenzeichen:

**17.9.2002, A** /

(60) Abhängigkeit:

(42) Beginn der Patentdauer:

Längste mögliche Dauer:

(45) Ausgabetag:

(56) Entgegenhaltungen, die für die Beurteilung der Patentierbarkeit in Betracht gezogen wurden:

Organische VerbindungenGebiet der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft isolierte Nukleinsäure-Moleküle, die für ein neues Protein aus *Acremonium chrysogenum* kodieren, Vektoren, die ein solches Nukleinsäure-Molekül umfassen, *Acremonium chrysogenum* - Wirtszellen, die mit einem solchen Vektor transformiert sind, und ein Verfahren zur Herstellung von Cephalosporin C unter Verwendung solcher transformierter Zellen.

Hintergrund der Erfindung

Cephalosporin C ist ein natürlicher Metabolit, der durch Fermentation des filamentösen Pilzes *Acremonium chrysogenum* (im folgenden als *A. chrysogenum* bezeichnet) in industriellem Massstab gewonnen wird. Diese Substanz bildet eine wichtige Vorstufe für eine Reihe halb-synthetischer Cephalosporin-Antibiotika. Die Substanzklasse der Cephalosporine ist von grosser therapeutischer Bedeutung. Ausbeutesteigerungen der industriellen Cephalosporin-Fermentation beruhen nebst verfahrenstechnologischen Verbesserungen im wesentlichen auf einer kontinuierlichen genetischen Stammverbesserung. Im Vordergrund moderner Methoden dieser Stammverbesserung steht immer mehr die Transformation von Produktionsstämmen mit spezifischen Genen, welche ein Potential zur Produktionssteigerung aufweisen. Für eine kleine Gruppe von bekannten Cephalosporin-Biosynthesegenen kann über das Verständnis biochemischer Zusammenhänge der Cephalosporin-Biosynthese ein Stammverbesserungs-Potential vermutet werden. Amplifikation, d.h. Erhöhung der Kopienzahl von solchen bekannten Genen, zeigt im Experiment teilweise tatsächlich eine signifikante Verbesserung der Produktivität eines Produktionsorganismus. Die Gruppe von bekannten Genen, für welche aus wissenschaftlichen Plausibilitätsüberlegungen heraus ein Stammverbesserungspotential vorhergesagt werden kann, ist allerdings sehr klein. Nebst diesen bekannten Biosynthesegenen kann aber eine unbekannte Zahl weiterer Gene vermutet werden, welche durch Amplifikation ebenfalls ein produktionssteigerndes Potential bewirken. Die Funktion solcher Gene ist häufig nicht bekannt, da die Gesamtheit der zellulären Prozesse mit Einfluss auf die Cephalosporin-Biosynthese zur Zeit noch sehr wenig verstanden wird.

Strategien zur Identifikation weiterer Gene mit produktionssteigerndem Potential sind daher von grosser Bedeutung.

Das Auffinden eines solchen weiteren, bisher unbekannten Gens bildet somit eine zentrale Aufgabe der vorliegenden Erfindung. Es ist somit eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine Nukleinsäure sowie Vektoren bereitzustellen, die für neues Protein aus *A. chrysogenum* kodieren und zur Transformation einer *A. chrysogenum* Wirtszelle verwendet werden können, so dass diese Wirtszelle in der Lage ist, Cephalosporin C in guten Ausbeuten zu liefern. Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung einer solchen Wirtszelle. Schliesslich ist es eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Herstellung von Cephalosporin C unter Verwendung der genannten Wirtszelle bereitzustellen.

#### Figuren

Figur 1 zeigt die Aminosäuresequenz (SEQ ID NR 1 = Sequenz-Identitäts-Nr. 1) eines neuen Proteins aus *A. chrysogenum*, die aus einem erfindungsgemässen Nukleinsäure-Molekül (Nukleinsäuresequenz gemäss Fig. 2 bzw. 4) hergeleitet wird. Die Darstellung erfolgt vom N-Terminus zum C-Terminus.

Figur 2 (SEQ ID NR 2) zeigt die genomische DNA-Sequenz einschliesslich der 3 Introns des kodierenden Bereichs eines genomischen Klons des im Rahmen der vorliegenden Erfindung gefundenen *A. chrysogenum*-Gens vom Translations-Start-Codon (ATG) bis zum letzten kodierenden Codon (TGG). Die Introns sind unterstrichen dargestellt. Dargestellt ist ein Einzelstrang von 5'- in 3'-Richtung.

Figur 3 (SEQ ID NR 3) zeigt die cDNA-Sequenz des kodierenden Bereichs des neuen Gens vom Translations-Start-Codon (ATG) bis zum letzten kodierenden Codon (TGG); dargestellt ist ein Einzelstrang von 5'- in 3'-Richtung.

Figur 4 (SEQ ID NR 4) zeigt die genomische DNA-Sequenz eines BamHI/EcoRI-Fragments eines genomischen Klons des neuen Gens (dargestellt ist ein Einzelstrang von 5'- in 3'-Richtung). Das Translations-Start-Codon (ATG) sowie das Translations-Stop-Codon (TAA)

des kodierenden Bereichs sind unterstrichen und fettgedruckt dargestellt. Die Introns sind unterstrichen dargestellt.

#### Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde ein neues Gen in *A. chrysogenum* gefunden, das für ein bisher unbekanntes Protein in *A. chrysogenum* kodiert. Das neue Gen liegt im nativen Zustand ca. 5,5 kb (Kilo-Basen) stromabwärts (in Translationsrichtung gelesen) des bekannten *A. chrysogenum* cefEF-Gens (S.E. Samson et al., *Biotechnology* 5 (1987), 1207-1214) auf demselben Chromosom im Genom von *A. chrysogenum*.

Das neue Gen wurde im *A. chrysogenum*-Stamm ATCC48272 (erhältlich unter dieser Nummer vom ATCC, American Type Culture Collection, Postfach 1549, Manassas, VA 20108, USA) gefunden.

Dieser Stamm ist bereits ausführlich charakterisiert worden, so als Produzent von Cephalosporinen, insbesondere Cephalosporin C (L.H. Malmberg und W.S. Hu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38 (1992), 122-128; Y.Q. Shen et al., *Bio-Technology* 4 (1986), 61-64); Isopenicillin N Synthetase (I.J. Hollander et al., *Science* 224 (1984), 610-612; J.M. Luengo et al., *Bio-Technology* 4 (1986), 44-47); Deacetoxy-Cephalosporin C Synthetase (Y.Q. Shen et al., *Enzyme Microb. Technol.* 6 (1984), 402-404); sowie ACV Synthetase (J. Zhang et al., *Curr. Microbiol.* 18 (1989), 361-367; J. Zhang und A.L. Demain, *Arch. Microbiol.* 158 (1992), 364-369).

Das neue Gen ist jedoch auch in anderen *A. chrysogenum*-Stämmen auffindbar. Alternativ sind die hier vorgestellten Nukleinsäure- und Aminosäure-Sequenzen bzw. -Moleküle synthetisch herstellbar.

Das Gen kodiert für ein Protein mit einer Länge von 526 Aminosäuren. Die Aminosäuresequenz ist in Figur 1 dargestellt. Der kodierende Bereich ist im Gen von 3 Introns unterbrochen, wie in Figuren 2 und 4 ersichtlich ist.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein isoliertes Nukleinsäure-Molekül, das für ein Protein kodiert, das die Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID NR 1 umfasst.

Ein solches Nukleinsäure-Molekül kann somit beispielsweise für ein Protein kodieren, das neben der aufgeführten Aminosäuresequenz (SEQ ID NR 1) noch weitere Aminosäuren enthält, beispielsweise für ein Fusionsprotein. Solche Fusionsproteine können beispielsweise eine Rolle spielen, wenn gewünscht ist, das neue Protein isoliert herzustellen. Die Fusionsanteile können beispielsweise die Stabilität erhöhen oder die Aufreinigung erleichtern.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung bevorzugt ist ein erfindungsgemässes Nukleinsäure-Molekül, das nur für eine Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID NR 1 kodiert. Ein solches Nukleinsäure-Molekül ist vorteilhaft zum Zwecke der im weiteren beschriebenen Produktion von Cephalosprin C einsetzbar. Somit ist ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ein erfindungsgemässes Nukleinsäure-Molekül, das für ein Protein kodiert, das ausschliesslich die Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID NR 1 aufweist.

Bevorzugterweise handelt es sich beim einem erfindungsgemässen Nukleinsäure-Molekül um ein DNA-Molekül. Alternativ kann es sich bei dem Nukleinsäure-Molekül um ein RNA-Molekül, insbesondere um ein mRNA-Molekül handeln.

Ein erfindungsgemässes DNA-Molekül kann beispielsweise hergestellt werden, indem eine genomische DNA-Bibliothek des Genoms des genannten *A. chrysogenum* Stammes ATCC48272 erzeugt wird. Man identifiziert einen genomischen Klon, der das bekannte *A. chrysogenum* cefEF-Gen und zusätzlich wenigstens etwa 10 kb Sequenz stromabwärts des cefEF-Gens enthält. Dies kann durch "Screening" mit homologen Sonden geschehen, deren Strukturen aus der bekannten Nukleinsäure-Sequenz des cefEF-Gens (S.E. Samson et al., s.o.) herleitbar sind. Entsprechende Techniken sind aus der Literatur bekannt (so z.B. in T. Maniatis et al., Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 1982, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA). Das gesuchte DNA-Molekül befindet sich auf einem etwa 2.5 kb grossen EcoR1/BamH1-Fragments eines solchen Klon, das mit klassischen Techniken isoliert oder hergestellt werden kann. Ein solches Fragment ist in Fig. 4 dargestellt. Eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft somit ein erfindungsgemässes Nukleinsäure-Molekül, umfassend eine Basensequenz gemäss SEQ ID NR 4 oder eine Basensequenz, die sich nur aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von der Sequenz gemäss SEQ ID NO. 4 unterscheidet. D.h., erfindungsgemäss sind

auch solche Nukleinsäure-Moleküle Gegenstand der vorliegenden Erfindung, die sich von den spezifisch aufgeführten Sequenzen dadurch unterscheiden, dass eines oder mehrere der aufgeführten Codons durch ein anderes oder mehrere andere derart ersetzt werden, dass sich die Aminosäuresequenz des kodierten Proteins (SEQ ID NR 1) nicht ändert. Dies gilt auch für die weiteren, im folgenden beschriebenen Nukleinsäure-Moleküle. Das Nukleinsäure-Molekül gemäss SEQ ID NR 4 enthält regulatorische Sequenzen (wie einen Promotor und ein Stop-Codon) und kann vorteilhaft zur Transformation, insbesondere in einem Vektor, von *A. chrysogenum* und damit zur Produktion von Cephalosporin C eingesetzt werden.

Das genannte etwa 2.5 kb grosse EcoR1/BamH1-Fragment umfasst insbesondere den kodierenden Teil des neuen Gens. Dieser Teil ist in Fig. 2 dargestellt und umfasst 3 Introns. Somit ist ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ein erfindungsgemässes Nukleinsäure-Molekül, umfassend eine Basensequenz gemäss SEQ ID NR 2 oder eine Basensequenz, die sich nur aufgrund der Degeneration des genetischen Codes, wie oben erläutert, von der Sequenz gemäss SEQ ID NO. 2 unterscheidet. Ein solches Nukleinsäure-Molekül entspricht somit der genomischen DNA-Sequenz des kodierenden Teils des neuen Gens. Weitere bevorzugte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung sind solche Nukleinsäure-Moleküle, die sich von dem der SEQ ID NR 2 durch das Fehlen von einem, zwei oder allen drei Introns unterscheiden.

Weiterhin bevorzugt ist somit ein erfindungsgemässes Nukleinsäure-Molekül, umfassend eine Basensequenz gemäss SEQ ID NR 3 oder eine Basensequenz, die sich aufgrund der Degeneration des genetischen Codes, wie oben erläutert, von der Sequenz gemäss SEQ ID NO. 3 unterscheidet. Eine solches Nukleinsäure-Molekül umfasst keines der genannten Introns mehr und ist als solches einer entsprechenden cDNA-Sequenz gleichzusetzen.

Weiterhin kann die Herstellung eines erfindungsgemässen Nukleinsäure-Moleküls (einschliesslich eines genannten cDNA-Moleküls) beispielsweise vollsynthetisch oder teilsynthetisch erfolgen. Erfindungsgemässe RNA- bzw. mRNA-Moleküle sind mittels Standardtechniken aus dem Mikroorganismus *A. chrysogenum* isolierbar oder synthetisch herstellbar. Es ist möglich, aus einer entsprechenden mRNA mit Standardtechniken ein entsprechendes cDNA-Molekül herzustellen.

Während die genannten Nukleinsäure-Moleküle durchaus weitere Basensequenzen enthalten können (um z.B. für ein Fusionsprotein zu kodieren), betreffen bevorzugte Ausführungsformen ein erfindungsgemässes Nukleinsäure-Molekül, das ausschliesslich eine Basensequenz aufweist, die ausgewählt ist aus der Gruppe der Basensequenzen SEQ ID NR 2, SEQ ID NR 3, SEQ ID NR 4 und einer Basensequenz, die sich nur aufgrund der Degeneration des genetischen Codes, wie oben erläutert, von einer der genannten Sequenzen unterscheidet.

In einer weiteren Ausführungsform umfassen erfindungsgemässe Nukleinsäure-Moleküle an ihrem C-Terminus unmittelbar nach dem Ende der kodierenden Region zusätzlich ein oder mehrere Stop-Codon(s). Bevorzugt ist das natürlich vorkommende Stop-Codon, das als TAA identifiziert wurde. Es sind jedoch auch die anderen Stop-Codons einsetzbar.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft einen Vektor, der eines der erwähnten erfindungsgemässen Nukleinsäure-Moleküle umfasst. Bevorzugt ist ein solcher Vektor zur Transformation einer Wirtszelle geeignet. Insbesondere handelt es sich bei einer solchen Wirtszelle um einen Mikroorganismus, insbesondere um *A. chrysogenum*. Ein solcher Vektor kann beispielsweise in Form eines Plasmids vorliegen. Ein solcher Vektor enthält, wo notwendig, neben einem erfindungsgemässen Nukleinsäure-Molekül weitere Sequenzen, z. B. einen Replikationsursprung und weitere regulatorische Elemente (Promotor, Translations-Terminationssignal usw.), so dass nach erfolgter Transformation eine Expression des erfindungsgemässen Nukleinsäure-Moleküls erfolgen kann. Nach erfolgter Transformation kann eine Integration eines erfindungsgemässen Nukleinsäure-Moleküls sowie weiterer Vektorelemente in das Genom der Wirtszelle erfolgen, was einer Amplifikation des kodierenden Teils des neuen Gens entspricht. Vorteilhafterweise umfasst eine erfindungsgemässe Vektor ein Nukleinsäure-Molekül, das eine Basensequenz gemäss SEQ ID NR 4 umfasst. Eine solche Basensequenz entspricht dem genannten EcoR1/BamH1-Fragment und umfasst bereits regulatorische Sequenzen, wie beispielsweise einen entsprechenden Promotor.

Solche Vektoren können nach Standard-Techniken durch Einklonieren eines erfindungsgemässen Nukleinsäure-Moleküls in geeignete Standard-Vektoren erzeugt werden.



Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft eine Wirtszelle, die mit einem erfindungsgemässen Vektor transformiert ist. Bevorzugt handelt es sich bei der Wirtszelle um einen Mikroorganismus, insbesondere um *A. chrysogenum*.

Die Transformation einer solchen Wirtszelle, insbesondere von *A. chrysogenum*, mit einem erfindungsgemässen Vektor erfolgt nach Standardverfahren. Ein solches Verfahren ist beispielsweise beschrieben in C. Nowak und U. Kück, Curr. Genet. 25 (1994), 34-40.

Eine erfindungsgemässe, transformierte *A. chrysogenum* - Wirtszelle kann vorteilhaft zur Herstellung von Cephalosporin C verwendet werden. Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur Herstellung von Cephalosporin C, umfassend die Kultivierung einer erfindungsgemässen *A. chrysogenum* - Wirtszelle unter Bedingungen, die geeignet sind, die Bildung von Cephalosporin C durch die Wirtszelle zu bewirken.

Geeignete Kultivierungs-/Fermentationstechniken sind dem Fachmann auf dem Antibiotika-Gebiet bekannt und werden seit langem bei der Herstellung von Cephalosporin C eingesetzt.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das erfindungsgemässe Verfahrens weiterhin die Isolierung des gebildeten Cephalosporin C. Das von einer erfindungsgemässen, transformierten *A. chrysogenum*-Wirtszelle gebildete Cephalosporin C wird in der Regel aus dem Mikroorganismus ausgeschleust und kann aus dem Kulturüberstand durch bekannte Techniken, beispielsweise chromatographische Techniken, aufgereinigt bzw. isoliert werden.

Erfindungsgemäss erzeugtes Cephalosporin C kann vorzugsweise zu weiteren Derivaten mit antibiotischen Eigenschaften umgesetzt werden.

Eine alternative Anwendung der vorliegenden Erfindung betrifft ein isoliertes Protein, dass eine Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID NR 1 umfasst. Wie erwähnt, umfasst ein solches Protein auch entsprechende Fusionsproteine, aus denen, wo gewünscht, durch Abspaltung ein reifes Protein mit einer Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID NR 1 erzeugt werden kann. Bevorzugt ist ein erfindungsgemässes Protein, wobei das Protein ausschliesslich die Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID NR 1 aufweist.

Ein erfindungsgemässes Protein kann dadurch hergestellt werden, dass eine geeignete prokaryontische oder eukaryontische Wirtszelle, die einen erfindungsgemässen, geeigneten Expressionsvektor enthält, der ein für das Protein kodierendes Nukleinsäure-Molekül umfasst, unter Bedingungen kultiviert wird, die eine Expression des Proteins bewirken. Das Protein kann mit üblichen Techniken aufgereinigt und isoliert werden. Geeignete prokaryontische Wirtszellen, bei denen insbesondere eine erfindungsgemässe cDNA eingesetzt wird, sind beispielsweise bakterielle Zellen, z.B. E. coli; geeignete eukaryontische Wirtszellen sind beispielsweise Säuger-Zellen, wie z.B. CHO- oder BHK-Zellen.

Solche erfindungsgemässen Proteine können in isolierter Form beispielsweise bei der synthetischen bzw. semi-synthetischen Herstellung von Cephalosporin C bzw. Derivaten davon eingesetzt werden. Üblich wäre beispielsweise die Immobilisierung an einer Synthese-Säule, an der eine Umsetzung stattfindet.

Auf die hierin erwähnten Referenzen wird hiermit vollinhaltlich Bezug genommen.

Die vorliegende Erfindung wird durch die folgenden Beispiele näher erläutert, sie ist jedoch nicht darauf beschränkt. Insbesondere betreffen die Beispiele bevorzugte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung.

#### Beispiele

Die hierin erwähnten Materialien und Reagenzien sind dem Fachmann geläufig, im Handel erhältlich oder leicht zugänglich und können nach den Anweisungen der Hersteller verwendet werden.

Beispiel 1: Identifikation eines neuen Gens und eines neuen Proteins aus A. chrysogenum

DNA-Sequenzen für die Cephalosporin-Biosynthesegene sowie flankierende Sequenzen können mit Hilfe von Lambda-Klonen erstellt werden. Solche Lambda-Klone können aus einer Lambda-Genbank mit DNA-Inserts von A. chrysogenum ATCC48272 isoliert werden. Die Konstruktion von Lambda-Genbanken ist z.B. in T. Maniatis et al. (siehe oben) erwähnt, ebenso das Screening von Lambda-Genbanken mittels der Lambda-Plauehybridisierung.

**Primer PCR1f** 5'- TTT GGG CGA GTG GGC TAA TA (SEQ ID NR 5)

**Primer PCR1r** 5'- CAA CAA CGC CTC TCC CGT CT (SEQ ID NR 6)



- 1) die beiden DNA-Moleküle werden über je eine kompatible EcoRI-Schnittstellen ligiert
- 2) die freistehenden Enden werden mit Klenow Enzym angepasst
- 3) die modifizierten Enden werden durch weitere Ligation verknüpft

Das Ligationsprodukt wird in *E. coli* (z.B. Stamm DH5alpha) eintransformiert und dort in einer für die weiteren Transformationsschritte ausreichenden Menge produziert und aufgereinigt. Bedingt durch den Konstruktionsweg können auch Plasmide resultieren, die das Nukleinsäure-Molekül in umgedrehter Orientierung enthalten; diese Strukturen sind aber

prinzipiell von gleicher Funktionalität. E. coli Klone mit dem gesuchten Plasmid können durch PCR mit den erwähnten PCR-Primern PCR1f und PCR1r identifiziert werden; das resultierende PCR-Produkt hat eine Länge von 2,5 kb. Diese PCR-Analysen können mit dem Expand High Fidelity PCR System von Roche Applied Science, gemäss den mitgelieferten Spezifikationen für die PCR-Reaktion durchgeführt werden. Eine nachfolgende Sequenzierung und Auswertung ergibt die in den Figuren 2 (SEQ ID NR 2) und 4 (SEQ ID NR 4) dargestellten Nukleinsäuresequenzen. Eine cDNA-Sequenz gemäss Figur 3 (SEQ ID NR 3) lässt sich dann daraus ableiten, ebenso wie die Aminosäuresequenz des kodierten Proteins gemäss Figur 1 (SEQ ID NR 1). Grundsätzlich kann eine abschliessende Verifikation des Klonierungsproduktes durch Sequenzierung und einen Sequenzvergleich mit den in den Figuren 2 bzw. 4 dargestellten DNA-Sequenzen erfolgen. Ein Plasmid, das das EcoR1/BamH-Fragment trägt, wird als Plasmid1 bezeichnet und nachfolgend verwendet.

#### Beispiel 2: Transformation von A. chrysogenum

Plasmid1 wird mittels einer Standardprozedur für Protoplastentransformation in A. chrysogenum ATCC48272 eintransformiert. Diese Methodik ist z.B. in Nowak und Kück (s.o.) beschrieben und beinhaltet eine Selektion von Transformanten auf benomylhaltigem Nähragar. Die Eigenschaften des für diese Selektion eingesetzten modifizierte Tubulin-Gens CA\_Tubulin(Tyr) auf Plasmid1 resp. pCN3 ist in Nowak und Kück (s.o.) beschrieben, ebenso der für Selektion benötigte benomylhaltige Nähragar. Transformanten aus solchen Experimenten können z.B. mittels PCR auf Anwesenheit der essentiellen Teile von Plasmid1 getestet werden. Die nachfolgenden PCR-Primer erlauben eine solche Testung:

Primer PCR2f 5'- GCA GAG CGC AGA TAC CAA (SEQ ID Nr 7)

Primer PCR2r 5'- CGT GGA CTC CAA CGT CAA (SEQ ID NR 8)

Das resultierende PCR-Produkt hat eine Länge von 8'279 bp. Die PCR-Analysen können z.B. mittels des Expand Long Template PCR Systems von Roche Applied Science, gemäss den mitgelieferten Spezifikationen für die PCR-Reaktion durchgeführt werden

Sinnvollerweise wird nebst einer Population von Transformanten mit Plasmid1 zu Kontrollzwecken eine Population von Transformanten mit pCN3 bereitgestellt. Diese Transformanten lassen sich in PCR-Ansätzen mit folgenden PCR-Primern analysieren

Primer PCR3f 5'- TTC CAT CCA GCA CCT CAC (SEQ ID NR 9)

Primer PCR3r 5'- CTT AAT GCG CCG CTA CAG (SEQ ID NR 10)

Das resultierende PCR-Produkt weist eine Länge von 2'290 bp auf.

### Beispiel 3: Produktion und Isolierung von Cephalosporin C

Die in Beispiel 2 erzeugten Transformanten werden in Kolbenfermentationsversuchen auf Cephalosporin-Produktion getestet. Sinnvollerweise wird parallel je eine etwa gleich grosse Population von ca. 500 Transformanten mit Plasmid1 und Kontrolltransformanten mit pCN3 verglichen. Hierzu werden Überstände dieser Kolbenfermentationen mittels HPLC-Analytik evaluiert. Ein entsprechendes Verfahren inkl. der zugehörigen Analytik ist z.B. in L. Karaffa et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 51 (1999), 633-638, beschrieben. Um statistisch relevante Datenmengen zu erhalten, werden diese Analysen mehrfach (z.B. 6 Mal) wiederholt, wobei bei jeder Wiederholung jeweils von jedem Stamm mehrere (z.B. 4) parallele Kolbenfermentationen durchgeführt und einzeln getestet werden. Es zeigt sich, dass auf diese Weise Stämme identifizierbar sind, die aus der Transformation mit Plasmid 1 stammen und eine reproduzierbar deutlich höhere Cephalosporin-Produktivität aufweisen als im Vergleich dazu die Population der pCN3 Kontrolltransformanten aufweist.

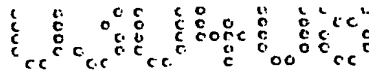
Die in der genannten Analytik eingesetzten HPLC-Säulen können auch bei der Aufreinigung bzw. Isolierung von gebildetem Cephalosporin C verwendet werden.

## Patentansprüche

1. Isoliertes Nukleinsäure-Molekül, das für ein Protein kodiert, das die Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID NR 1 umfasst.
2. Nukleinsäure-Molekül gemäss Anspruch 1, das für ein Protein kodiert, das ausschliesslich die Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID NR 1 aufweist.
3. Nukleinsäure-Molekül gemäss einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei das Nukleinsäure-Molekül ein DNA-Molekül ist.
4. Nukleinsäure-Molekül gemäss Anspruch 3, umfassend eine Basensequenz gemäss SEQ ID NR 2 oder eine Basensequenz, die sich nur aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von der Sequenz gemäss SEQ ID NO. 2 unterscheidet.
5. Nukleinsäure-Molekül gemäss Anspruch 3, umfassend eine Basensequenz gemäss SEQ ID NR 3 oder eine Basensequenz, die sich nur aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von der Sequenz gemäss SEQ ID NO. 3 unterscheidet.
6. Nukleinsäure-Molekül gemäss Anspruch 3, umfassend eine Basensequenz gemäss SEQ ID NR 4 oder eine Basensequenz, die sich nur aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von der Sequenz gemäss SEQ ID NO. 4 unterscheidet.
7. Nukleinsäure-Molekül gemäss Anspruch 3, das ausschliesslich eine Basensequenz aufweist, die ausgewählt ist aus der Gruppe der Basensequenzen SEQ ID NR 2, SEQ ID NR 3, SEQ ID NR 4 und einer Basensequenz, die sich nur aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von einer der genannten Basensequenzen unterscheidet.
8. Vektor, umfassend ein Nukleinsäure-Molekül gemäss einem der Ansprüche 1 bis 7.
9. Vektor gemäss Anspruch 8, wobei der Vektor zur Transformation einer Wirtszelle geeignet ist.
10. Vektor gemäss Anspruch 9, wobei die Wirtszelle ein Mikroorganismus ist.

- 

me Paul



Figur 1.(SEQ ID NR 1): Aminosäuresequenz des von einem erfindungsgemässen Nukleinsäure-Molekül kodierten Protein (dargestellt vom N-Terminus zum C-Terminus)

MASPIASAAL	KARIRRPSML	KKLCKPQDLM	HHFPNGSYIG	WSGFTGVGY P	KKMPTYMADH
VEQNGLGQKL	KYSLEFVGASS	GAETENRWAS	LDMIDRRTPH	QVGKAISKGI	NEGKIHFFDK
HLSMFPVDLV	YGYT KD RPH	NKLDVVVVEA	TDIKEDGSIV	PGASVGATPE	LIQMADKIII
EVNTSLPSFE	GLHDITMTDL	PPLRKPYLVM	GVEDRIGRTS	IPIDPEKVVG	ILES DYQDAT
APNAEADESA	NKIAGHLIEF	FEHEVAHGRL	PNSLLPLQSG	IGNVANAIIG	GLDNSNFRNL
KVWTEVIQDT	FLDLFDSGRL	DFATATSIRF	SPDGFRRFYD	NWEAYYGKLL	LRSQQVSNSP
EIIRRLGVIA	MNTPVEVDIY	AHANSTCVMG	SRMLNGLGGS	ADFLRSSKYS	IMHTPSTRPS
KTDPHGVSCI	VPMCTHIDQT	EHDLDVIVTE	QGLADVRLS	PRERARVIK	KCAHPVYQPI
LTHYFEKAES	DCLRKGWGHE	PHLLFNSFDL	HKALVEHGSM	QKVGQW	



Figur 2 (SEQ ID NR 2): Genomische DNA-Sequenz des kodierenden Bereichs eines genomischen Klon des neuen Gens vom Translations-Start-Codon (ATG) bis zum letzten kodierenden Codon (TGG). Die Introns sind unterstrichen dargestellt. Dargestellt ist ein Einzelstrang von 5'- in 3'-Richtung.

```

ATGGCATCAC CAATAGCCTC TGCCGCCCTC AAGGCGCGCA TTCGCCGCCC CTCGATGCTC
AAGAAGCTGT GCAAGCCCCA GGATTTGATG CATCACTTCC CCAATGGCTC GTACATTGGC
TGGTCCGGCT TCACCGGCGT CGGCTACCCG AAGTGAGTTC CACCGTCATC CCGCTCCACA
GTAGGCGCAG CCGGCCCCGT GACAGTCCCC GACAGGAAAA TGCCGACCTA CATGGCCGAT
CACGTCGAGC AGAACGGCCT TCAGGGCAAG CTGAAGTACT CGCTATTCTG GGGCGCATCG
TCGGGTGCTG AGACAGAGAA TCGCTGGGCG TCGCTCGACA TGATTGATAG GAGGACCCCG
CATCAGGTCG GCAAGGCCAT CTCCAAGGGC ATCAATGAGG GCAAGATCCA CTTCTTCGAC
AAGCATCTCT CCATGTTCCC CGTGGACCTT GTATACGTAC GTCAACGATG ATCCCTTGGA
ATGTGCATGT ACTACGAGTA CCTGGCGCTA ACATCCGGTC AGGGCTACTA CACAAAGGAT
AGACCCACA ACAAGCTGGA CGTGGTGGTG GTGGAGGCCA CCGACATCAA AGAGGACGGA
AGCATTTGAT CCGGAGCTTC AGTCGGCGCG ACCCCCGAGC TCATCCAGAT GGCCGATAAG
GTGAGCAATT TCGATTTCTA GCGGAGGGCG CAGCAGGACC TGACATCTCC CTGTGCAGAT
CATTATCGAG GTCAACACCT CACTGCCTTC ATTGAGGGT CTCCACGACA TCACCATGAC
CGACCTGCCC CCGCTACGGA AGCCCTATCT CGTCATGGGT GTCGAGGACC GCATCGGCAG
GACCTCTATC CCTATCGACC CCGAGAAGGT TGTAGGCATC CTCGAATCCG ACTACCAGGA
CGCCACTGCC CCCAACGCCG AGGCCGACGA GAGTGCGAAC AAGATTGCTG GCCACTTGAT
TGAGTTCTTC GAGCACGAGG TCGCCACGG CCGTCTCCCG AACTCCCTCC TTCCCCTCCA
GTCCGGCATC GGCAACGTCG CCAACGCCAT CATCGGTGGC CTCGACAACT CCAACTTCCG
CAACCTCAAG GTCTGGACTG AGGTTATCCA GGACACCTTC CTCGACCTCT TCGACTCGGG
CCGCCTCGAC TTTGCCACGG CCACCTCTAT CCGCTTCTCC CCCGACGGTT TCCGCCGGTT
CTACGACAAC TGGGAGGCCCT ACTACGGCAA GCTCCTCCTC CGCAGCCAGC AGGTGTCCAA
CTCGCCCGAG ATCATCCGCC GCCTTGGTGT CATTGCCATG AACACCCCCG TCGAGGTCTGA
CATCTACGCC CACGCCAACT CCACCTGCGT CATGGGCTCG CGCATGCTCA ACGGCCTGGG
CGGCTCCGCC GACTTCTTGC GCTCCTCCAA GTACTCTATC ATGCACACCC CGTCCACCCG
CCCCTCCAAG ACCGACCCGC ACGGCGTCTC GTGCATCGTT CCCATGTGCA CCCACATCGA
CCAGACTGAG CACGACCTCG ACGTCATCGT CACCGAGCAG GGCCTGGCCG ACGTGCGCGG
CCTGAGCCCC AGGGAGAGGG CCCGCGTCAT CATCAAGAAG TGCGCCCACC CGGTCTACCA
GCCCATCCTG ACCCACTACT TTGAGAAGGC CGAGAGCGAC TGCCTACGCA AGGGCTGGGG
CCACGAGCCC CATCTGCTCT TCAACTCGTT TGACCTGCAC AAGGCCCTCG TGGAGCACGG
AAGCATGCAG AAGGTCGGGC AGTGG

```

Figur 3 (SEQ ID NR 3): cDNA-Sequenz des kodierenden Bereichs des neuen Gens vom Translations-Start-Codon (ATG) bis zum letzten kodierenden Codon (TGG). Dargestellt ist ein Einzelstrang von 5'- in 3'-Richtung.

```
ATGGCATCAC CAATAGCCTC TGCCGCCCTC AAGGCGCGCA TTCGCCGCC CTCGATGCTC
AAGAAGCTGT GCAAGCCCCA GGATTGATG CATCACTTCC CCAATGGCTC GTACATTGGC
TGGTCCGGCT TCACCGGCGT CGGCTACCCG AAGAAAATGC CGACCTACAT GGCCGATCAC
GTCGAGCAGA ACGGCCTTCA GGGCAAGCTG AAGTACTCGC TATTCGTGGG CGCATCGTCG
GGTGCTGAGA CAGAGAATCG CTGGGCGTCG CTCGACATGA TTGATAGGAG GACCCCGCAT
CAGGTCGGCA AGGCCATCTC CAAGGGCATC AATGAGGGCA AGATCCACTT CTTGACAAG
CATCTCTCCA TGTTCCCCGT GGACCTTGTA TACGGCTACT ACACAAAGGA TAGACCCAC
AACAAGCTGG ACGTGGTGGT GGTGGAGGCC ACCGACATCA AAGAGGACGG AAGCATTGTA
CCCGGAGCTT CAGTCGGCGC GACCCCGAG CTCATCCAGA TGGCCGATAA GATCATTATC
GAGGTCAACA CCTCACTGCC TTCATTGAG GGTCTCCACG ACATCACCAT GACCGACCTG
CCCCCGCTAC GGAAGCCCTA TCTCGTCATG GGTGTCGAGG ACCGCATCGG CAGGACCTCT
ATCCCTATCG ACCCCGAGAA GGTTGTAGGC ATCCTCGAAT CCGACTACCA GGACGCCACT
GCCCCAACG CCGAGGCCGA CGAGAGTGCG AACAAGATTG CTGGCCACTT GATTGAGTTC
TTCGAGCACG AGGTCGCCCC CGGCCGTCTC CCGAACTCCC TCCTTCCCCT CCAGTCCGGC
ATCGGCAACG TCGCCAACGC CATCATCGGT GGCCTCGACA ACTCCAATT CCGCAACCTC
AAGGTCTGGA CTGAGGTTAT CCAGGACACC TTCCTCGACC TCTTCGACTC GGGCCGCCTC
GACTTTGCCA CGGCCACCTC TATCCGCTTC TCCCCGACG GTTTCGCGG GTTCTACGAC
AACTGGGAGG CCTACTACGG CAAGCTCCTC CTCCGCAGCC AGCAGGTGTC CAACTCGCCC
GAGATCATCC GCCGCCTTGG TGTCATTGCC ATGAACACCC CCGTCGAGGT CGACATCTAC
GCCCACGCCA ACTCCACCTG CGTCATGGGC TCGCGCATGC TCAACGGCCT GGGCGGCTCC
GCCGACTTCC TGCCTCCTC CAAGTACTCT ATCATGCACA CCCCCTCCAC CCGCCCCCTC
AAGACCGACC CGCACGGCGT CTCGTGCATC GTTCCCATGT GCACCCACAT CGACCAGACT
GAGCACGACC TCGACGTCAT CGTCACCGAG CAGGGCCTGG CCGACGTGCG CGGCCTGAGC
CCCAGGGAGA GGGCCCGCGT CATCATCAAG AAGTGCGCC ACCCGGTCTA CCAGCCCATC
CTGACCCACT ACTTTGAGAA GGCCGAGAGC GACTGCCTAC GCAAGGGCTG GGGCCACGAG
CCCCATCTGC TCTTCAACTC GTTTGACCTG CACAAGGCCC TCGTGGAGCA CGGAAGCATG
CAGAAGGTCG GGCAGTGG
```

Figur 4 (SEQ ID NR 4): Genomische DNA-Sequenz eines BamHI/EcoRI-Fragments eines genomischen Klon des neuen Gens (dargestellt ist ein Einzelstrang von 5'- in 3'-Richtung). Das Translations-Start-Codon (ATG) sowie das Translations-Stop-Codon (TAA) des kodierenden Bereichs sind unterstrichen und fettgedruckt dargestellt; die Introns sind unterstrichen dargestellt.

```

GAAG ATCGCATTG GCGAGTGGG CTAATAATGC CTGCTGCCTG CCTGTGGACG
GTAAATGAAT TAGGTGGAAT GTGTCGCAA TTGAGGGGAA TGGCCCCCTT ATCATATAAA
GTGCCAATGC GATACTATGG CGTGGCGTGG GGTGCGGTCG GTGTCCGGCC GGTGGAACGG
AGGTCCCGGC TATCAATAGG CCGTAGGCCG GCATTGAATC GGTTCCACCG TATTCCAGAC
ACCCAAGGAA GGCCCGCCAC CCCCAGCTCC GGCTGGGGA TAGCGCCGAG TGGAGCACTC
ACGGGGGCGG TGTTGACTC GAAGACGCGT CGTGATTGGC CAGAACTTCA TCCCCCTCTG
CCAAGTATTG GTTCACGGGA TTCGGCGACG TCAACGACCC CACCGGCCCG GATTACATAA
GGTGCACTGC AGCTACTACG TAGTACTCGT ACTTGGGAAG GAGGGACCC TGGGGTCGGA
GGTTTTAAAG GCAATGGCTT CTTCGCTGGT CCACCCAACC TGACTCTCAC TCTCCCTTTT
ACCTCGCTCC TCTGATTATT CCCTCGTCTG CGTCTGGATT TCATCTCTTT CCCCTCCCGG
CCCCTTTGGA TCTCTGCTCT CCCCTCCTCT CTCCCCCGCA TTGGTGTGTA AAACCACTGT
CCCGCGGCCT CGCGACGAGT GACGTACTGC AAGCCGAAAC CTCACAATCC CTTCTCACA
ATGGCATCAC CAATAGCCTC TGCCGCCCTC AAGCGCGCA TTCGCGCCC CTCGATGCTC
AAGAAGCTGT GCAAGCCCCA GGATTGATG CATCACTTCC CCAATGGCTC GTACATTGGC
TGGTCCGGCT TCACCGGCGT CGGCTACCCG AAGTGAGTTC CACCGTCATC CCGCTCCACA
GTAGGCGCAG CCGGCCCGCT GACAGTCCCC GACAGGAAAA TGCCGACCTA CATGGCCGAT
CAGTTCGAGC AGAACGGCCT TCAGGGCAAG CTGAAGTACT CGCTATTCTG GGGCGCATCG
TCGGGTGCTG AGACAGAGAA TCGCTGGGCG TCGCTCGACA TGATTGATAG GAGGACCCCG
CATCAGGTCG GCAAGGCCAT CTCCAAGGGC ATCAATGAGG GCAAGATCCA CTTCTTCGAC
AAGCATCTCT CCATGTTCCC CGTGGACCTT GTATACGTAC GTCAACGATG ATCCCTTGGG
ATGTGCACTG ACTACGAGTA CCTGGCGCTA ACATCCGGTC AGGGCTACTA CACAAAGGAT
AGACCCACA ACAAGCTGGA CGTGGTGGTG GTGGAGGCCA CCGACATCAA AGAGGACGGA
AGCATTGTAC CCGGAGCTTC AGTCGGCGCG ACCCCCGAGC TCATCCAGAT GGCCGATAAG
GTGAGCAATT TCGATTCTA GCGGAGGGCG CAGCAGGACC TGACATCTCC CTGTGCAGAT
CATTATCGAG GTCAACACCT CACTGCCTTC ATTGAGGGT CTCCACGACA TCACCATGAC
CGACCTGCCC CCGCTACGGA AGCCCTATCT CGTCATGGGT GTCGAGGACC GCATCGGCAG
GACCTCTATC CCTATCGACC CCGAGAAGGT TGTAGGCATC CTCGAATCCG ACTACCAGGA
CGCCACTGCC CCCAACGCGG AGGCCGACGA GAGTGCGAAC AAGATTGCTG GCCACTTGAT
TGAGTTCTTC GAGCACGAGG TCGCCACGG CCGTCTCCCG AACTCCCTCC TTCCCCTCCA
GTCCGGCATC GGCAACGTCG CCAACGCCAT CATCGGTGGC CTCGACAACT CCAACTTCCG
CAACCTCAAG GTCTGGACTG AGGTTATCCA GGACACCTTC CTCGACCTCT TCGACTCGGG
CCGCCTCGAC TTTGCCACGG CCACCTCTAT CCGCTTCTCC CCCGACGGTT TCCGCCGGTT
CTACGACAA TGGGAGGCCT ACTACGGCAA GCTCCTCCTC CGCAGCCAGC AGGTGTCCAA
CTCGCCCGAG ATCATCCGCC GCCTTGGTGT CATTGCCATG AACACCCCCG TCGAGGTCGA
CATCTACGCC CACGCCAACT CCACCTGCGT CATGGGCTCG CGCATGCTCA ACGGCCTGGG
CGGCTCCGCC GACTTCTGCT GCTCCTCCAA GTACTCTATC ATGCACACC CGTCCACCCG
CCCCTCCAAG ACCGACCCGC ACGGCGTCTC GTGCATCGTT CCCATGTGCA CCCACATCGA
CCAGACTGAG CACGACCTCG ACGTCATCGT CACCGAGCAG GGCCTGGCCG ACGTGCAGCG
CCTGAGCCCC AGGGAGAGGG CCCGCGTCAT CATCAAGAAG TGCGCCCACC CGGTCTACCA
GCCCATCCTG ACCCACTACT TTGAGAAGGC CGAGAGCGAC TGCCTACGCA AGGGCTGGGG
CCACGAGCCC CATCTGCTCT TCAACTCGTT TGACCTGCAC AAGGCCCTCG TGGAGCAGCG
AAGCATGCAG AAGGTCGGGC AGTGGTAAAG TTGGCGAGAC GGGAGAGGCG TTGTTGTAGG
AGTTGGAAT AGAATCAGAT ATACAGCCTT TCATATATGT AGATAATGGA GCCATT

```

Die vorliegende Erfindung betrifft isolierte Nukleinsäure-Moleküle, die für ein neues Protein aus *Acremonium chrysogenum* kodieren, Vektoren, die ein solches Nukleinsäure-Molekül umfassen, *Acremonium chrysogenum* - Wirtszellen, die mit einem solchen Vektor transformiert sind, und ein Verfahren zur Herstellung von Cephalosporin C unter Verwendung solcher transformierter Wirtszellen.



PCT Application  
**EP0310289**

